

THESIS

MUNICH

1965

✓hp

ZUM NACHWEIS
ÖSTROGENWIRKSAMER RÜCKSTÄNDE
IN CHEMISCH
KAPAUNISIERTEN SCHLACHTHÄHNCHEN

KLAUS SCHRÖDER

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. L. Kotter

ZUM NACHWEIS ÖSTROGENWIRKSAMER RÜCKSTÄNDE IN
CHEMISCH KAPAUNISIERTEN SCHLACHTHÄHNCHEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Klaus Schröder
aus
Reutlingen

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. Kotter

Referent: Prof. Dr. L. Kotter

Tag der Promotion: 26.2.1965

Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153516_0085

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	
1. Anwendung östrogenen Substanzen in der Tiermast	3
2. Nebenwirkungen bei der Östrogenanwendung	4
3. Gefahren für die menschliche Gesundheit aus der Anwendung von Östrogenen bei Schlachttieren	5
4. Zum Nachweis von Östrogenrückständen	7
C. Eigene Untersuchungen	
I. Material und Methodik	
1. Allgemeines	12
2. Behandlung der Versuchstiere	12
3. Östrogennachweis mit Hilfe des Mäuseuterus-Testes	13
4. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	14
II. Hauptversuche	
1. Untersuchung von bestimmten Tierkörperteilen	14
a) Verfütterung des Probenmaterials (Testreihe 1a)	15
b) Injektion von Gewebeextrakten aus Organen und Körpergeweben (Testreihe 1b)	15
c) Besprechung der Ergebnisse aus den Testreihen 1a und 1b	23

2.	Untersuchung von ganzen Tierkörpern	
a)	subkutane Applikation des aufgearbeiteten Tierkörpers an Testmäuse (Testreihe 2a)	25
b)	Verfütterung des aufgearbeiteten Tierkörpers an Testmäuse (Testreihen 2b - d)	25
c)	Besprechung der Ergebnisse aus den Testreihen 2a - d	36
3.	Feststellung von Rückständen in ganzen Tierkörpern bei Verfütterung von östrogenwirksamer Substanz (Testreihen 3a - d)	38
	Besprechung der Ergebnisse	38

D.	Diskussion	43
----	------------	----

E.	Zusammenfassung	45
----	-----------------	----

F.	Literaturverzeichnis	47
----	----------------------	----

Lebenslauf

A. EINLEITUNG

In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben östrogenwirksame Stoffe bei der Mast von Haustieren große Bedeutung erlangt. Ihr Wirkungsmechanismus war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Da Rückstände dieser Substanzen im Fleisch für den Menschen bedenklich sein können, ist es nach § 4b Nr. 2 LMG, *expressis verbis* verboten, "lebenden Tieren Stoffe mit östrogenen ... Wirkung einzupflanzen, einzuspritzen oder unvermischt oder nach Vermischen mit Futtermitteln oder anderen Stoffen zu verabfolgen, um die Beschaffenheit des Fleisches oder den Fleisch- oder Fettansatz zu beeinflussen" (100). Die Lebensmittelüberwachung ist also direkt aufgefordert, ein etwaiges Vorkommen solcher Rückstände in Fleisch zu erfassen. Für den Nachweis von selbst geringsten Mengen an östrogenwirksamen Verbindungen existieren verschiedene Methoden. Es eignete sich jedoch keine für Routineuntersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geprüft werden, ob eine dieser Methoden ohne Beeinträchtigung ihrer Empfindlichkeit für Routineuntersuchungen vereinfacht werden kann.

B. LITERATUR

1. Anwendung östrogenen Substanzen in der Tiermast

Östrogene wurden erstmals in den USA zur hormonellen Kastration von Hähnen verwendet und erlangten in dieser Anwendungsform erhebliche Bedeutung. Bereits 1947 traf die Food and Drug Administration des US-Gesundheitsministeriums bestimmte Regelungen für die Verabreichung von weiblichen Sexualhormonen an Geflügel; so wurden für die einmalige Implantation von Diäthylstilböstrol (DES) 15 bis 25 mg pro Tier angegeben. Diese Menge reichte aus, um auch bei sehr schweren Hühnerrassen eine 8 bis 10 Wochen anhaltende Sterilisation zu sichern (49).

NESENI (73) erreichte mit Implantaten von 12,5 bis 50 mg Dienöstroldiacetat pro Hahn ebenfalls temporäre Kastration.

Auch bei Bullen wurden Versuche mit östrogenen Stoffen durchgeführt. So berichteten BRÜGGEMANN (6, 12), KLOSTERMANN (54, 55), HALAMA (36, 37) und TSCHIDERER (90) über Gewichtsmehrzunahmen bei Jungbullen, die Diäthylstilböstrol bzw. Hexöstrol erhalten hatten.

HÖPLER (39) und NORDFELDT (75) konnten dagegen durch Verabreichung von entsprechenden Verbindungen keine eindeutigen Gewichtszunahmen beobachten. HALAMA (36, 37) und RJASANKI (79) berichten später, daß Vorteile in der Gewichtsentwicklung nach Östrogenverabreichung hauptsächlich in den ersten Versuchswochen zu erwarten sind; dabei spielen aber in erster Linie Präparatwahl, Dosierungsgröße, Verabreichungsform und Alter des Individuums eine Rolle. BRÜGGEMANN und Mitarbeiter (6, 12) hatten Jungbullen 20 mg DES pro Tier und Tag oral verabreicht, andere Autoren (3, 13, 14, 36, 37, 63) zwischen 24 und 140 mg DES implantiert.

BRÜGGEMANN und KARG (12) beobachteten bei täglicher Verabreichung von nur 10 mg DES pro Tier und Tag bei Jungochsen bis zu 20 % Mehrzunahmen während der drei- bis viermonatigen Endmast; außerdem wurde die Futterverwertung verbessert. Auch BURROUGHS (14) konnte bei Mastochsen durch kontinuierliche Zufütterung von 5 bis 10 mg DES pro Tier und Tag erhebliche Mehrzunahmen erzielen.

Von allen Autoren wurde bei Östrogenanwendung in der Großtiermast Mastbeschleunigung, d. h. Mehrzunahme an Fleisch, und zwar ohne Qualitätsverschlechterung beobachtet. Beim Geflügel wurden hellere Fleischfarbe, besondere Zartheit des Fleisches und vorteilhafte Erweichung der Haut notiert (9, 11, 13, 20, 23, 31, 48, 53, 64, 78, 80), was auf eine bei dieser Tierart unmittelbar bewirkte Lipogenese zurückgeführt wird. CAMP (17, 18) konnte sogar mit proteinärmerem Futter bessere Fleischqualitäten erzielen.

BOLLE (9) faßt die Wirkung der Östrogenimplantate beim Geflügel so zusammen, daß das Fleisch der Tiere "saftiger und schmackhafter" wird und eine stärkere Ausbildung der Brustmuskulatur erfolgt.

Die bisher besprochene Literatur zeigt, daß östrogenwirksame Futterzusätze den Fett- und Proteinaufbau fördern. Inzwischen wurde aber auch die Stoffwechselbeeinflussung durch Östrogene studiert. Es zeigte sich, daß ihnen bei der Mastbeeinflussung primäre Bedeutung, der Sexualwirksamkeit dagegen untergeordnete zuerkannt werden mußte. In diesem Zusammenhang konnte in Versuchen an Schafen und Ochsen nach Östrogenverabreichung eine positive N-Bilanz beobachtet werden, was für ein "echtes" Mehrwachstum spricht (20, 95).

Im übrigen ist es schwer, ein einheitliches Bild der Wirkung der Östrogene aufzustellen, da sie u. a. von Dosierung, Applikation und Art des Präparates sowie Art und Alter des Tieres sehr weitgehend abhängt. BRÜGGEMANN, KARG und BARTH (11) haben Einzelheiten über die Östrogenwirkung zusammenfassend referiert. Weitere wichtige Arbeiten zu diesem Thema sind im Literaturverzeichnis aufgeführt: (1 - 4, 6, 7, 9 - 14, 18, 21, 28, 33 - 35, 46, 53, 55, 56, 72 - 74, 81 - 85, 95, 98).

2. Nebenwirkungen bei der Östrogenanwendung

Da es sich bei den Östrogenen um biologisch stark wirksame Verbindungen handelt, waren von Anfang an Bedenken gegen ihre Anwendung als Masthilfsmittel gerechtfertigt, denn neben dem Masteffekt mußten schädliche Nebenwirkungen erwartet werden (27, 38).

Für die in den USA bei der Rindermast zugelassenen Dosierungen waren keine nachteiligen Auswirkungen am Tier festzustellen, auch die Geschlechtsfunktionen

scheinen bei diesen Dosierungen nicht beeinträchtigt zu sein (51a). Erst bei einer Verabreichung von 200 mg DES pro Tier und Tag an Ochsen konnte GOSETT (34) Vergrößerung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und eingefallene Beckenbänder beobachten und kam somit an die Verträglichkeitsgrenze.

Beim Geflügel wurden dagegen deutliche Nebenwirkungen festgestellt, was insofern nicht verwunderlich ist, als die bei Hühnern früher in der Praxis angewandten Dosierungen bezogen auf das Körpergewicht wesentlich höher lagen als beim Rind. BIRD (7) konnte bei Hähnen nach Dosen von 20 mg DES pro Tier und Tag einen irreversiblen Sterilisationseffekt hervorrufen. Bei darunter liegenden Dosen vollzog sich die Regeneration aus der "temporären Sterilisation" nach dem Absetzen der Östrogenfütterung innerhalb von 4 bis 7 Wochen. CHAIKOFF (19) und LINDSAY (62) stellten bei älteren Hähnen nach der Implantation von Östrogenpräparaten atheromatöse Schäden in der Aorta fest. GOUSAGA (35) beobachtete bei manchen Tieren Hepatitis, fettige Degeneration des Herzens sowie Ovarzysten. GASSNER (30) stellte fest, daß beim Töten und Rupfen der mit Östrogenen gemästeten Schlachthähnchen häufig Spontanfrakturen auftraten, die auf endostale Hyperossifikation der Knochen zurückzuführen waren. Über ähnliche Beobachtungen berichten GODFREY und JAAP (33) sowie NAPP (72).

3. Gefahren für die menschliche Gesundheit aus der Anwendung von Östrogenen bei Schlachttieren

Noch wichtiger als etwaige Nebenerscheinungen beim Masttier ist die mögliche Wirkung irgendwelcher Östrogenrückstände in Schlachttierteilen auf den Konsumenten.

Besondere Bedenken bestehen bei der Anwendung von Östrogenpreßlingen bzw. -pasten und der damit verbundenen Anreicherung östrogenen Wirkstoffe im Bereich der Depotstellen. Von den Herstellerfirmen östrogenwirksamer Präparate werden zwar für die Injektion oder Implantation Körperstellen empfohlen, die bei den üblichen Schlachtmethode ausnahmslos unschädlich beseitigt werden, doch ist weder ein Mißbrauch der Präparate, noch die Gefahr eines Verzehr solcher Depotstellen ausgeschlossen, wie gelegentlich frühere Berichte über Effeminierungseffekte bei Männern annehmen lassen. Darüber hinaus sind jedoch auch ganz allgemein östrogenwirksame Rückstände in Fleisch oder Organen des Schlachttieres als Gefahr für den Konsumenten zu bedenken.

Das Problem der Verteilung der Rückstände von Östrogen-Applikationen im Tierkörper war schon vielfach Gegenstand entsprechender Untersuchungen.

HOPWOOD und Mitarbeiter (41) behandelten Hähnchen mit ^{14}C -markiertem DES und bestimmten auf Grund der radioaktiven Impulse und der biologischen Aktivität von verschiedenen Organen sowie von Faeces Verteilung, Abbau und Ausscheidung dieser Substanz. Besonders hohe Anreicherungen waren in Leber, Galle, Fettgewebe sowie im Faeces nachzuweisen. 30 Tage nach der Verabreichung ließen sich noch 0,7 % des injizierten DES-Pastenpräparates im Tierkörper feststellen. Aus den Injektionsdepots ließen sich nach 25 Tagen praktisch keine Rückstände mehr feststellen. Zusammen mit GASSNER und KARG konnte HOPWOOD (42) ebenfalls bei Hähnchen beweisen, daß ein großer Teil des DES-Präparates als stark inaktiviertes, wasserlösliches Glukuronid ausgeschieden wird. MAZUR und SHORR (68) kamen früher bei Kaninchen zu gleichen Ergebnissen.

Bei Untersuchungen über die Verteilung der Östrogene im Gewebe des Tierkörpers konnte HOPWOOD (40) 25 Tage nach Injektion von 15 mg DES nur in Haut, Herz, Leber, Galle, Milz und Lunge, nicht jedoch in Bauchfett und Muskulatur, Rückstände nachweisen. KARG (52) konnte noch 4 Wochen nach Implantation von 20 mg DES-Preßlingen Östrogenrückstände in Haut, Leber und Galle nachweisen. In Leber und Galle wurden dabei jedoch stets bedeutend höhere Werte gefunden. STOB und Mitarbeiter (86, 87) bestimmten 28 Tage nach der Implantation eines DES-Präparates im Muskelfleisch von Hähnchen 1 ♂ pro 100 g. MERKER und Mitarbeiter (70) konnten dagegen keine signifikanten DES-Rückstände im Geflügeltierkörper feststellen. KOCH und Mitarbeiter (56 - 59) fanden bei Hähnchen 9 Wochen nach Verabreichung eines DES-Präparates Rückstandsmengen von 5 mg DES in Haut bzw. 350 ♂DES in Leber pro 100 g. BRÜGGEMANN und KARG (11) errechneten aus diesen Literaturangaben für die genußtauglichen Teile des Tierkörpers eine Gesamtmenge von 3,1 - 3,4 mg östrogenwirksamer Substanz, wobei aber Depotrückstände - z.B. schlecht resorbierte Preßlinge - nicht berücksichtigt wurden.

Günstiger liegen die Werte von Östrogenrückständen bei Verfütterung dieser Substanzen,

Trotzdem konnte LORENZ (65) bei Hähnchen nach Zusatz von 0,0033 - 0,013 % Dienöstroldiacetat zum Futter noch 3 bis 10 ♂ östrogenwirksamer Substanz pro 100 g Fett zurückbestimmen. KARG (52) fand bei Versuchen mit 0,0023 % Lipamon (Dienöstroldiacetat) im Futter, obwohl erst 24 Stunden vor

der Schlachtung mit der Verabreichung des Präparates ausgesetzt worden war, nur in Leber und Galle des Schlachthähnchens meßbare Rückstände. Bei weiteren Untersuchungen dieser Art waren selbst in diesen Organen keine eindeutigen Rückstandsnachweise möglich.

Die bisherigen Arbeiten zeigen, daß die östrogenwirksamen Rückstände meist, immer aber bei Verfütterung der Östrogene, unter der als therapeutisch wirksam angegebenen Menge von 1 mg DES liegen (71). Toxische Mengen wurden nur in einem früheren Versuch bei sehr hoch dosierten Östrogenimplantaten bei Hühnern (57) gefunden. Auch eine canzerogene Wirkung dieser DES-Mengen ist sehr unwahrscheinlich; es sei hier auf die umfangreiche Literatur über dieses Thema verwiesen: (15, 23a, 26, 44, 45, 47, 61, 94, 96).

4. Zum Nachweis von Östrogenrückständen

Diese Erfassung der Rückstände hängt vor allem von der Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode ab. Ein Verfahren läßt schon die Erfassung von 10^{-4} µg pro kg Ausgangssubstanz zu, mittels anderer Methoden können erst mg-Einheiten nachgewiesen werden.

Grundsätzlich wird zwischen chemischen bzw. chemo-physikalischen (25, 43) und biologischen Nachweisverfahren unterschieden.

Da östrogenwirksame Substanzen in der chemischen Struktur oft sehr verschieden sind, wurden gerade in letzter Zeit zur Identifizierung dieser Stoffe neue Reaktionen entwickelt.

UMBERGER und Mitarbeiter (91) führten derartige Untersuchungen mit Hilfe von Kolorimetrie, Fluorometrie und Papierchromatographie durch.

Mc KINLEY und Mitarbeiter (69) beschrieben die Plasmalogen-Reaktion, die auf dem Nachweis von Acetal-Phosphatiden im Fettgewebe beruht und bei Hähnchen sowie nicht legenden Junghennen negativ ausfallen soll, bei östrogenbehandelten Hähnen und Legehennen jedoch positiv.

BANES (5) wies östrogene Stoffe chemisch nach. FIREGOOD und Mitarbeiter (25) verwendeten die Ultraviolett-Absorptionsspektrophotometrie zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Östrogenen.

Auch durch radioaktive Markierung östrogenen Substanzen können etwaige Rückstände auf Grund ihrer Strahlungsintensität quantitativ bestimmt werden (32, 41, 42, 71).

Diesen chemischen bzw. chemo-physikalischen Methoden steht die große Gruppe der sehr empfindlichen biologischen Nachweisverfahren gegenüber. Sie erfassen alle Verbindungen, die der Wirkungsdefinition der Östrogene entsprechen und zwar unabhängig von ihrer chemischen Struktur. Dabei werden am Versuchstier (Maus, Ratte) die in einer Größenordnung von 10^{-7} g wirksamen Stoffe erfaßt.

Das Auftreten von östrogenen Substanzen im Tierkörper kann im wesentlichen auf 3 Quellen zurückgeführt werden:

1. auf die endogene Produktion des Individuums (individuelle Schwankungen liegen innerhalb einer bestimmten Größenordnung),
2. auf Zufütterung von Östrogenen zu Therapie- oder Mastzwecken und
3. auf die Verfütterung von östrogenhaltigen Pflanzen (sogenannte Phytoöstrogene liegen z.B. in Soja, Hopfen und bestimmten Kleearten vor) (77).

Der klassische biologische Östrogennachweis wurde von ALLEN und DOISY entwickelt. Er beruht auf der brunstauslösenden Wirkung der Östrogene bei kastrierten weiblichen Versuchstieren. Als Versuchstiere werden weibliche Nager benutzt, deren histologisches Scheidenbild nach Östrogenverabreichung innerhalb von 4 Tagen die typischen Erscheinungen einer Brunst aufweist. Diesen Test haben BUTENANDT und ZIEGNER (16) ausführlich beschrieben. STOB und COLOMBEL (21, 86, 87) führten ergänzende Untersuchungen durch; sie verabreichten das Testmaterial peroral.

GALLI-MAININI (29) benutzte die spezielle Empfindlichkeit bestimmter Krötenarten (*Bufo vulgaris*) auf östrogene Substanzen für den Schwangerschaftsnachweis bei Frauen. Die Testsubstanz (Urin, Blutserum) wird hierbei den männlichen Kröten in den Lymphsack injiziert. Innerhalb von 6 Stunden kommt es dann zur Abscheidung von Spermatozoen im Harn. Weniger bekannt ist der Östrogennachweis nach CURTIS und DOISY (22), bei dem die vorzeitige Öffnung der Vagina von infantilen Nagern und anschließende Brunsterscheinung als Maß für das Vorhandensein von Östrogenen gewertet wird. Den Versuchstieren - meist 18 bis 20 Tage alten Mäusen - wird dabei an 3 aufeinanderfolgenden Tagen das Untersuchungsmaterial injiziert.

PARKES (76) wertet als Nachweis für Östrogene die durch diese Substanzen verursachte Veränderung des Gefieders bei geeigneten Hühnerrassen aus.

ASCHHEIM und ZONDEK (97) führten 1927 die nach ihnen benannte Östrogenreaktion in die Humanmedizin ein. Der Test wird mit infantilen Mäusen durchgeführt, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen das zu untersuchende Material in absteigenden Mengen (0,4 - 0,2 ml) subkutan verabreicht bekommen. Im positiven Fall kann nach 5 Tagen die rein qualitative Auswertung an Hand der Eierstocksbefunde erfolgen, wobei Follikelreifung, Blutpunkte, Gelbkörperbildung sowie Uterusgröße bewertet werden. KÜST (60) modifizierte diese Reaktion zur Trächtigkeitsdiagnose bei Stuten. Hierbei werden Schwellung und Rötungsgrad des Uterus mitbewertet.

Der Mäuseuterus-Test nach UMBERGER, GASS und CURTIS (92) wird sehr häufig für wissenschaftliche Untersuchungen angewendet. Das Untersuchungsmaterial kann dabei den Versuchstieren - infantilen Ratten oder Mäusen (21 - 23 Tage alt) - direkt verfüttert oder als Extrakt subkutan injiziert werden. Nach 6 bis 8 Tagen erfolgt dann im Vergleich zu Kontroll- und Standardtieren die Auswertung. Das positive Ergebnis ergibt sich aus relativen Gewichtsveränderungen an den infantilen Uteri; eine Umrechnung auf quantitative Östrogenwerte ist möglich. Diese Methode empfiehlt die Food and Drug Administration in den USA zur Rückstandsbestimmung von Östrogenen in Futtermitteln oder Schlachttieren.

THIEL und SCHAAAL (88, 89) führten Rückstandsbestimmungen von Östrogenen bei Hähnchen im Hinblick auf eine Lebensmittelüberwachung mit Hilfe dieses Mäuseuterus-Testes durch, doch werteten sie außer der Gewichtsveränderung des Uterus auch histologische Veränderungen der Uterusschichten im Vergleich zu Kontrollen aus.

Durch Modifikation des Mäuseuterus-Testes gelang es ZUNDEL und RINJARD (99), bereits nach 2 - 3 Tagen positive Reaktionen zu erhalten.

Das empfindlichste Verfahren in dieser Reihe wurde von MARTIN und Mitarbeitern (66, 67) entwickelt, welche die zellwachstums- und zellteilungsfördernde Wirkung östrogenen Substanzen auf das Vaginalepithel mit TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) nachwiesen. Als Testtiere dienen kastrierte weibliche Mäuse, denen die Testsubstanz in wässriger Lösung vaginal verabreicht wird. TTC, eine gelbe, ungiftige und wasserlösliche Substanz, wird von verschiedenen intrazellulären Reduktasen zu einer stabilen, wasserunlöslichen und tiefrot gefärbten Verbindung reduziert (Formazan). Nach Lösung dieses Stoffes in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, kann dann kolorimetrisch die Reduktion und somit der Gehalt an östrogenen Substanzen festgestellt werden.

KARG (52) verwendete für diesen Test als Versuchstiere kastrierte weibliche Ratten und konnte so größere Substanzmengen verabreichen. Dieser Test besitzt eine so hohe Empfindlichkeit, daß östrogene Substanzen bereits in physiologischen Gewebskonzentrationen im Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden können.

KARG (48) hat die Voraussetzungen und die Empfindlichkeitsgrenzen der 3 bekanntesten, hier beschriebenen Nachweismethoden in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt:

Tabelle 1

Östrogenbestimmungsverfahren zur Untersuchung von
Futterzusätzen und Organrückständen nach Karg (48)

Östrogentest	Tierart	Empfohlene Applikation	Empfindlichk. für DES	Vorarbeiten	Testdauer in Tagen	Geeignet zur Untersuchung von
Vaginalausstrich (ALLEN-DOISY-TEST)	Maus	oral	2,5 mcg/kg	Kastration der	8 - 11	Futterzusätzen
	Ratte	oral	10 mcg/kg	Testtiere	6 - 8	Östrogendepots insbesondere auch qualitative Bestimmungen
Uterusgewicht (UMBERGER)	Maus	oral	2 mcg/kg	keine	2 - 8	Futterzusätzen
	Ratte	parenteral	2 mcg/kg		2 - 8	Östrogenrückständen Maus: bei wenig Ratte: bei reichlich Ausgangsmaterial
Vaginalmitosen Nachweis mit TTC (MARTIN)	Maus	vaginal	$5 \cdot 10^{-5}$ in 0,01 ml	Kastration d. Testtiere	2	Futterzusätzen
	Ratte	"	$5 \cdot 10^{-5}$ in 0,05 ml	Extraktion (Verseifung) u. Anreicherung der Proben	2	Depotrückständen

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. MATERIAL UND METHODIK

1. Allgemeines

Für den Nachweis von Östrogenrückständen in Schlachttieren muß der Lebensmittelüberwachung eine Methode zur Verfügung stehen, die kleinste Mengen nachweisen läßt und doch einfach durchzuführen ist. Es kommen somit nur biologische Verfahren in Frage, die Östrogenmengen von 2 - 5 ~~pro~~ ^{µg} pro kg Untersuchungsmaterial sicher erfassen lassen.

Das einfachste Verfahren, das diese Forderungen erfüllt, dürfte der Mäuseuterus-Test nach UMBERGER und Mitarbeitern sein. Bei der Durchführung dieses Tests sind weder entsprechende Vorbereitungen der Testtiere, noch allzu schwierige chemische Analysen des Probenmaterials notwendig; es kann unter Umständen sogar direkt an die verwendeten Testtiere (Mäuse oder Ratten) verabreicht werden.

2. Behandlung der Versuchstiere

Als Versuchstiere (Untersuchungsmaterial) dienten 40 Hähnchen einer Hy-line Mastrasse. 20 Tiere (Untersuchungsgruppe 1 + 4) wurden als Kontrollen mit handelsüblichen Fertigfuttermitteln ernährt, 10 Tiere (Untersuchungsgruppe 2) erhielten im Alter von 6 Wochen eine einmalige Implantation von 20 mg Diäthyl-dioxystilben (KAPAUNETTEN "Bayer") am Kammende unter die Haut und wurden genau 4 Wochen danach geschlachtet. Den restlichen 10 Tieren (Untersuchungsgruppe 3) wurde ebenfalls im Alter von 6 Wochen 4 Wochen lang bis 24 Stunden vor der Schlachtung Futter zugeführt, das mit 0,0023 % Lipamon versetzt war. Alle Tiere erhielten während der Versuchsdauer handelsübliche Futterfertigmittel, bei denen eventuelle Östrogengehalte durch vorsorgliche Untersuchungen ausgeschlossen waren.

3. Östrogennachweis mit Hilfe des Mäuseuterus-Testes

21 Tage alte, weiße, weibliche Mäuse erhielten in gleich schweren Gruppen zu je 4 bzw. 5 Tieren Gewebsextrakte aus Schlachthähnchen sowohl oral als auch subkutan verabreicht, außerdem wurde das Gewebe auch direkt verfüttert. Parallel zu jedem fraglichen Test wurden entsprechend schwere Mäusegruppen untersucht, die mit nicht behandelten Hähnchen (Kontrolltieren) bzw. einer bekannten Menge östrogenwirksamer Substanz (Diäthylstilböstrol) behandelt worden waren.

Während der Versuchsdauer (5 - 7 Tage) erhielten die Tiere "Versuchsfutter für Mäuse"⁺⁾ sowie frisches Wasser ad libidum. Das Futter wurde in Portionen zu je 3 g pro Tier und Tag aufgeteilt. Die Futterbehälter wurden täglich gereinigt und mit den neuen Tagesportionen aufgefüllt. In der 1. Versuchsreihe wurde das nicht aufgenommene Futter aus den Tagesportionen zurückgewogen. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß die angefallenen minimalen Futterreste bei der Versuchsbeurteilung vernachlässigt werden können. Einen Tag vor Beendigung des Testes wurde das Futter abgesetzt und sämtliche Tiere am nächsten Tag mit Äther eingeschláfert. Sodann wurden die Uteri entnommen und vom anhaftenden Fett- und Bindegewebe befreit. Die Eileiter wurden abgetrennt, ebenso die Cervix (am orificium internum). Die so präparierten Uteri wurden bis zur weiteren Auswertung in Bouin'scher Fixierlösung⁺⁺⁾ aufbewahrt. Vor der Wägung der einzelnen Uteri wurde ihr flüssiger Inhalt zwischen Filterpapier ausgestreift. Jede gesicherte Gewichtszunahme der Uteri gegenüber den Kontrollen wurde als qualitativer Östrogennachweis gewertet. Eine quantitative Aussage erfolgte nur im Vergleich zu solchen Uteri, die durch eine bekannte Menge östrogen Substanzen eine bestimmte Gewichtszunahme erfahren hatten. Die hierfür notwendigen Berechnungen werden an anderer Stelle erläutert.

+) Versuchsfutter "Grün" für Mäuse aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München

++) Bouin'sche Fixierlösung:

15 Teile wäßrige, gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile Formaldehyd,
1 Teil Eisessig.

4. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Für die orale Verabreichung von Geflügelgewebe an Testtiere wurde eine bestimmte Menge Muskulatur, Haut, Bauchfett, Leber, Niere sowie die gesamte Galle mit dem östrogenfreien Mäuseversuchsfutter innig vermischt.

Ausgehend von der Überlegung, daß östrogenwirksame Substanzen meist fett- und somit ätherlöslich sind, wurde in allen weiteren Untersuchungen das Probenmaterial aus Versuchs- und Kontrollhähnchen zerkleinert, im Trockenofen über Seesand bei maximal 60°C getrocknet und anschließend das Gesamtfett mit Hilfe von peroxydfreiem Äther extrahiert. Die so gewonnene Fettmenge wurde entweder - wie bei Galle, Leber und Muskulatur - mit Mäuseversuchsfutter vermischt an die Testmäuse verfüttert oder in Sesamöl DAB 6 aufgelöst am 1., 3. und 5. Versuchstag in Mengen von je 0,2 ml pro Tier subkutan injiziert. Bei größeren Fettmengen empfahl es sich, den Fettanteil von etwaigen Östrogenrückständen abzutrennen. Dabei wurde, in Anlehnung an die von BÖHMER und GROSSFELD (8) beschriebene Methode wie folgt verfahren: Je 100 g Fettsubstanz werden mit 60 ml einer 66 %igen KOH und 140 ml 95 %igem Äthylalkohol auf dem Wasserbad bei 80°C verseift. Die Seifenlösung wird anschließend im warmen Zustand in einen Schütteltrichter von 2,5 Liter Fassungsvermögen verbracht, dem zuvor 300 ml Aqua dest. hinzugefügt worden waren. Der Verseifungskolben wurde 3 x mit je 100 ml Aqua dest. sowie 100 ml peroxydfreiem Äther nachgewaschen und auch diese Lösungen in den Schütteltrichter gegeben. Nach Ansäuern dieser gesamten Lösung mit H_2SO_4 wurde 2 x mit je 800 ml peroxydfreiem Äther kräftig ausgeschüttelt und die wäßrige Phase von der Ätherphase abgetrennt. Um eventuelle Seifenreste zu entfernen, wurde die Ätherfraktion anschließend 5 x mit je 10 ccm Aqua dest. "gewaschen". Nach Abdampfen des Äthers im Vakuum-Rotationsverdampfer war der unverseifbare ätherlösliche Rückstand gewonnen und wurde den Testmäusen entweder mit dem Futter verabreicht oder in Sesamöl gelöst injiziert.

II. HAUPTVERSUCHE

1. Untersuchung von bestimmten Tierkörperteilen

Um zu prüfen, in welchen genußtauglichen Tierkörperteilen des Geflügels und in welchen Größenordnungen östrogenwirksame Rückstände mit Hilfe des Mäuse-

uterus-Testes nachgewiesen werden können, wurden 2 Hähnchen aus Untersuchungsgruppe 2 (einmalige Implantation von 20 mg Diäthyldioxytilben) sowie 2 entsprechende Kontrolltiere aus Untersuchungsgruppe 1 in Haut, Muskulatur, Bauchfett, Leber, Galle und Niere aufgeteilt und die einzelnen Gewebs- bzw. Organteile getrennt im Star-Mix zerkleinert.

a) Verfütterung des Probenmaterials (Testreihe 1a)

Das zerkleinerte Untersuchungsgut je eines Versuchs- und Kontrollhähnchens wurde getrennt nach den entsprechenden Gewebs- bzw. Organanteilen an je 6 Mäuse-Testgruppen zu je 4 Tieren mit Mäusefutter vermischt in Portionen zu je 3 g pro Tier und Tag verabreicht. Für die quantitative Auswertung erhielten 4 weitere Testgruppen, bestehend aus jeweils 4 Mäusen, einen Futterzusatz von 0, 3, 9 und 27 μ g pro kg Futter. Die DES-Mengen wurden dabei in Alkohol gelöst dem Mäusefutter zugesetzt. Der Alkohol wurde auf dem Sandbad unter ständigem Rühren anschließend wieder abgedampft. Die nicht aufgenommenen täglichen Futterrationen wurden zurückgewogen. Die Tiere wurden 5 Tage lang gefüttert und am 7. Tag nach Versuchsbeginn mit Äther eingeschläfert. In Tabelle 2 sind die Anfangskörpergewichte der Mäuse aus dieser Testreihe aufgeführt, in Tabelle 3 die verfütterten Gewebsmengen.

b) Injektion von Gewebeextrakten aus Organen und Körpergeweben (Testreihe 1b)

Die Organe und Gewebe des 2. Hähnchens aus den Untersuchungsgruppen 1 und 2 wurden im zerkleinerten Zustand über Seesand im Trockenofen getrocknet und daraus in beschriebener Weise Extrakte hergestellt. Die Extrakte aus Muskulatur, Haut, Bauchfett, Leber, Galle und Nieren wurden in je 6 Testgruppen mit 5 etwa gleich schweren Mäusen am 1., 3. und 5. Tag des Versuches in Mengen von 0,2 ml pro Tier subkutan injiziert. Zum quantitativen Vergleich erhielten 5 weitere entsprechende Mäusegruppen 0, 1, 3, 6 und 12 μ g DES, bezogen auf Futtermenge in kg, in Sesamöl gelöst injiziert. Die Testtiere erhielten während des Versuches 3 g Versuchsfutter für Mäuse pro Tier und Tag.

In Tabelle 4 sind die Anfangskörpergewichte der Mäuse-Testgruppen zusammengestellt, in Tabelle 5 die extrahierten Gewebsmengen.

Tabelle 2
Anfangskörpergewichte der Mäuse (in g) in Testreihe 1a

Nr. des Tieres	Gruppen des behandelten Hähnchens						Gruppen des Kontrollhähnchens						Gruppen für quantitativen Vergleich			
	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	0 ♂	3 ♂	9 ♂	27 ♂
1	8,7	9,7	9,0	8,5	8,7	9,1	9,1	9,4	9,0	8,1	9,5	9,7	8,5	9,8	9,3	8,6
2	8,9	9,4	9,5	9,7	9,3	8,6	9,5	8,9	9,4	9,3	9,2	8,6	8,8	9,1	8,7	9,8
3	8,5	8,9	8,9	9,5	9,5	9,4	8,6	8,9	8,5	8,6	8,9	8,9	9,9	9,3	9,0	8,9
4	9,1	9,7	9,4	9,9	8,5	8,9	9,2	9,2	9,5	10,0	8,8	9,6	9,2	8,6	9,4	9,5
Gesamtge- wichte	35,2	37,7	36,8	37,6	36,0	36,0	36,4	36,4	36,4	36,0	36,4	36,8	36,4	36,8	36,4	36,8
Durch- schnittsge- wichte	8,8	9,4	9,2	9,4	9,0	9,0	9,1	9,1	9,1	9,0	9,1	9,2	9,1	9,2	9,1	9,2
Standardab- weichung	0,24	0,35	0,29	0,62	0,52	0,36	0,37	0,24	0,45	0,83	0,32	0,54	0,61	0,5	0,32	0,55

Tabelle 3

Testreihe 1a (verfütterte Gewebsmengen in g; Anteil des Untersuchungsmaterials am Gesamtfutter in %)

Gewebe	behandeltes Hähnchen		unbehandeltes Hähnchen	
	g	%	g	%
Haut	48	80	48	80
Muskulatur	48	80	48	80
Fett	12	20	12	20
Leber	45	75	45	75
Galle	2	3,3	1,8	3
Niere	13	22	12	20

Tabelle 5

Testreihe 1b (extrahierte Gewebsmenge in g)

Gewebe	behandeltes Hähnchen	unbehandeltes Hähnchen
	g	g
Haut	185	186
Muskulatur	220	220
Fett	23	26
Leber	48	46
Galle	2,1	2,0
Niere	22	23

Tabelle 6

Uterusgewichte der Mäuse (in mg) in Testreihe 1a

Nr. des Tieres	Gruppen des behandelten Hähnchens						Gruppen des unbehandelten Hähnchens						Gruppen für quantitativen Vergleich			
	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	0 ♂	3 ♂	9 ♂	27 ♂
1	8,9	7,9	8,9	13,2	9,7	8,7	9,8	8,3	6,0	8,6	7,8	10,4	11,3	12,9	16,3	59,9
2	8,4	6,1	8,4	13,4	9,5	9,7	8,3	6,5	7,0	7,4	7,1	11,9	12,3	9,9	39,2	47,1
3	8,2	8,1	9,5	18,4	13,8	7,8	10,0	6,1	12,5	9,5	7,1	5,9	7,9	11,5	20,5	54,3
4	7,8	-	7,0	13,6	8,7	7,9	10,0	8,2	8,8	5,5	10,4	5,8	8,8	10,8	21,3	50,6
Gesamtge- wichte—	33,4	22,1	33,8	58,6	41,7	34,1	38,1	29,1	34,3	31,0	32,4	34,0	40,3	45,1	97,3	211,9
Durch- schnittsge- wichte	8,4	7,4	8,5	14,7	10,4	8,5	9,5	7,3	8,6	7,8	8,1	8,5	10,0	11,3	24,3	54,0
Standard- abweichung	0,47	1,1	0,69	2,51	2,29	0,88	0,82	1,14	2,86	1,73	1,57	3,12	2,07	1,27	10,16	6,79

Tabelle 4

Anfangskörpergewichte der Mäuse (in g) in Testreihe 1b

Nr. des Tieres	Gruppen des behandelten Hähnchens						Gruppen des Kontrollhähnchens						Gruppen für quantitativen Vergleich				
	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	0 J	1 J	3 J	6 J	12 J
1	8,3	8,8	7,9	8,4	8,6	8,4	8,9	8,8	7,0	8,6	8,7	9,2	8,1	8,2	8,0	8,3	9,0
2	8,7	8,7	8,3	8,0	7,9	8,3	8,7	8,5	8,3	8,5	8,4	8,4	8,5	7,9	8,2	8,6	8,7
3	8,5	8,9	8,9	8,7	8,5	8,5	7,9	7,9	8,9	9,0	7,8	8,6	8,9	8,3	8,0	8,6	8,1
4	9,0	8,4	8,9	8,5	8,0	7,8	8,4	9,4	9,1	8,7	8,6	8,2	8,4	9,1	8,5	7,5	8,4
5	8,4	7,9	8,5	7,8	8,1	8,0	8,1	7,9	8,7	8,3	8,0	8,6	8,1	8,5	8,3	7,5	8,3
Gesamtgewichte	43,0	42,7	42,5	41,5	41,1	41,0	42,0	42,5	42,0	43,1	41,5	43,0	42,0	42,0	42,0	40,5	42,5
Durchschnittswerte	8,6	8,5	8,5	8,3	8,2	8,2	8,4	8,5	8,8	8,7	8,3	8,6	8,4	8,4	8,4	8,1	8,5
Standardabweichung	0,27	0,4	0,42	0,41	0,31	0,29	0,41	0,64	0,32	0,27	0,28	0,38	0,33	0,45	0,38	0,56	0,35

Tabelle 7

Uterusgewichte der Mäuse (in mg) in Testreihe Ib

Nr. des Tieres	Gruppen des behandelten Hähnchens						Gruppen des unbehandelten Hähnchens						Gruppen für quantitativen Vergleich				
	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	Haut	Musk.	Fett	Leber	Galle	Niere	0 ♂	1 ♂	3 ♂	6 ♂	12 ♂
1	12,0	8,4	7,8	14,7	12,5	7,8	5,7	6,7	6,7	11,3	9,6	7,4	9,5	12,8	23,1	37,7	54,5
2	8,7	9,2	10,8	12,1	6,6	6,4	6,9	8,3	7,8	8,5	6,6	9,0	5,7	13,9	16,8	29,2	58,1
3	8,4	6,7	9,9	8,3	12,5	4,8	9,3	6,2	11,5	6,3	10,7	5,3	6,9	11,1	15,0	44,1	37,8
4	5,4	10,0	5,9	7,6	8,1	5,2	7,6	9,4	4,0	6,3	4,9	5,5	6,5	8,4	13,0	27,6	33,0
5	5,2	7,2	8,1	15,5	7,3	5,0	6,4	7,6	8,2	6,0	7,2	7,7	8,5	9,5	13,1	17,2	42,2
Gesamge- wichte	39,7	41,5	42,5	57,6	47,0	29,2	35,9	38,2	38,2	38,4	39,0	34,9	37,1	55,7	81,0	155,8	225,6
Durch- schnittsge- wichte	7,9	8,3	8,5	11,5	9,4	5,8	7,2	7,6	7,6	7,7	7,8	7,0	7,4	11,1	16,2	31,2	45,1
Standardab- weichung	2,87	1,33	1,91	3,61	2,88	1,26	1,37	1,29	2,71	2,22	2,34	1,56	1,72	2,27	10,53	4,16	10,55

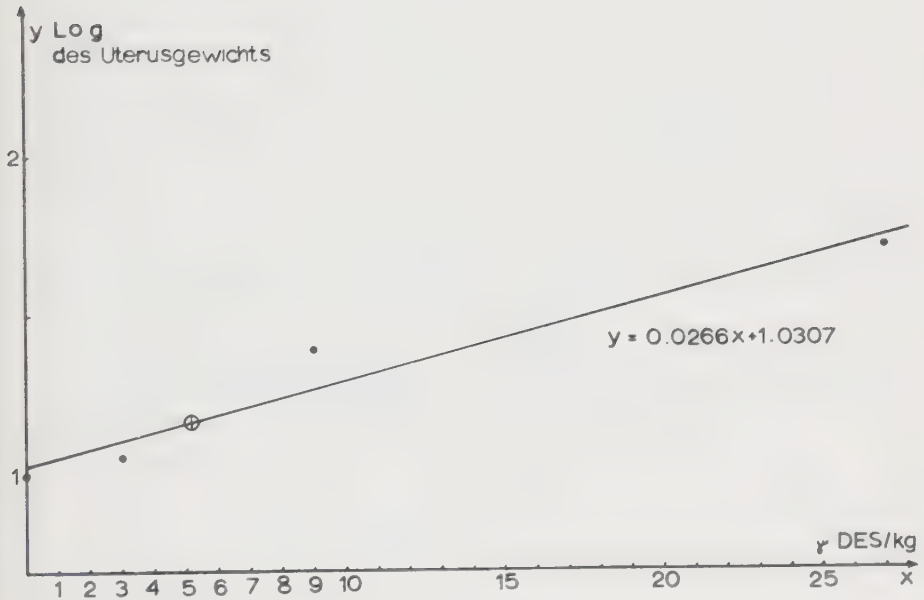


Abb. 1: Regressionskurve für Testreihe 1a
 (Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
 Verabreichung) mit einem Rückstandswert der Leber
 bei 5,13 *μg*

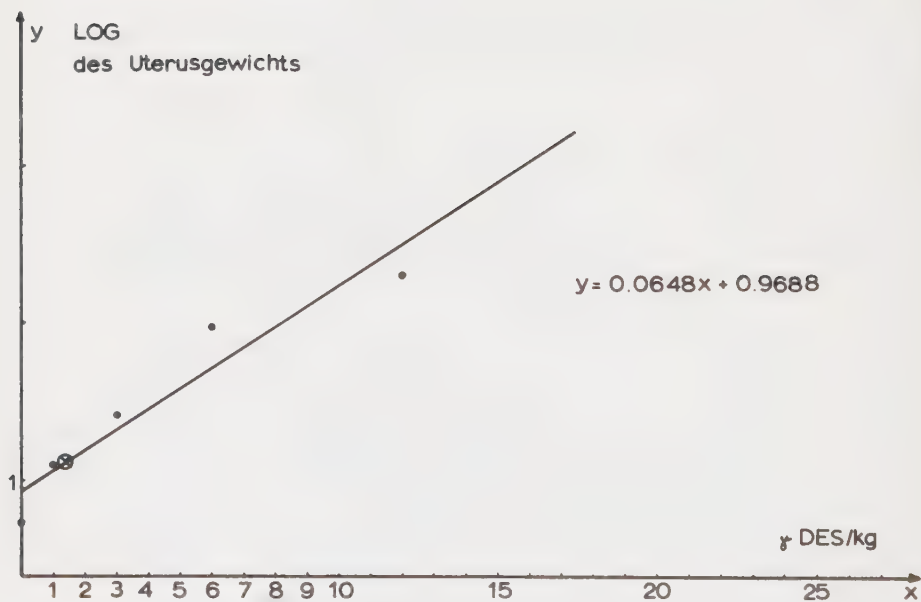


Abb. 2: Regressionskurve für Testreihe 1b
(Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
Verabreichung) mit einem Rückstandswert der Leber bei 1,4 μ

c) Besprechung der Ergebnisse aus den Testreihen 1a und 1b

Bei der Untersuchung von bestimmten Tierkörperteilen konnten im Mäuseuterus-Test sowohl nach der Verfütterung von Gewebe (Testreihe 1a), als auch nach der Injektion von Gewebsextrakten (Testreihe 1b) in der Leber beachtliche Mengen östrogenwirksamer Substanz festgestellt werden (siehe die in den Tabellen 6 und 7 zusammengestellten Uterusgewichte). Dagegen ließen sich in der Galle wider Erwarten nur geringfügige östrogenwirksame Rückstände nachweisen, was auf die relativ geringe Menge an Untersuchungsmaterial zurückzuführen sein dürfte. In allen übrigen Tierkörperteilen waren keine Rückstände zu ermitteln. Die Verfütterung des Testmaterials hat sich als geeignete Verabreichungsmethode erwiesen. Die aufgenommene Gewebsmenge kann hierbei genau bestimmt werden. Bei der subkutanen Injektion des Testmaterials muß die Resorption größeren Schwankungen unterliegen, da bei den einzelnen Uteri gleicher Testgruppen starke Gewichtsunterschiede aufgetreten waren. An den Injektionsstellen hatten sich außerdem z.T. erhebliche entzündliche Reaktionen ausgebildet; vielleicht wurde die Aufnahme der Testsubstanzen vor allem dadurch beeinflusst.

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Vergleichswerte aus den Testreihen 1a und 1b (Tabelle 6 und 7) halblogarithmisch dargestellt (Zunahme der Uterusgewichte der Testmäuse in log gegen verabreichte DES-Menge in μ g pro kg).

Die Diagramme erhält man über Regressionsgleichungen:

$$1) \quad b = \frac{n \cdot S_{xy} - (S_x) \cdot (S_y)}{n \cdot S_x^2 - (S_x)^2}$$

$$2) \quad y - \bar{y} = b \cdot (x - \bar{x})$$

b = Regressionskoeffizient

n = Anzahl der Testgruppen

S_x = Summe der in allen Gruppen verabreichten DES-Mengen

x = Einzeldosis DES

$\bar{x}$ = Durchschnitt der verabreichten DES-Menge

y = log des Uterusgewichtes

$\bar{y}$ = Durchschnitt des log aus den erhaltenen Uterusgewichten der Testtiere

Für die Verfütterung des Testmaterials (für Testreihe 1a) ergibt sich somit:

x	y	xy	Sx = 39
			$Sx^2 = 819$
0	1,00	0	Sy = 5,16
3	1,05	3,15	Sxy = 62,10
9	1,39	12,51	$\bar{x} = 9,75$
27	1,72	46,44	$\bar{y} = 1,29$
			n = 4

Regressionsgleichung: $y = 0,0266 x + 1,0307$

Für 45 g untersuchte Leber des behandelten Hähnchens ergibt sich bei diesem Vergleich ein Wert von 5,13 μ g DES-Rückstand oder 11,4 μ g DES pro 100 g Leber.

Die gleichen Berechnungen für die Injektion des Testmaterials (Testreihe 1b) ergeben:

x	y	xy	Sx = 22
			$Sx^2 = 190$
0	0,87	0	Sy = 6,27
1	1,05	1,05	Sxy = 33,5
3	1,21	3,63	$\bar{x} = 4,4$
6	1,49	8,97	$\bar{y} = 1,254$
12	1,65	19,85	n = 5

Regressionsgleichung: $y = 0,0648 x + 0,9688$

Für die 48 g untersuchte Leber des behandelten Hähnchens errechnet sich daraus ein DES-Rückstand von 1,4 μ g oder 2,96 μ g pro 100 g Leber. Dieser Wert liegt nahe der Nachweisgrenze des Mäuseuterus-Testes. Bei der Bestimmung der Uterusgewichte war jedoch die Gewichtszunahme gegenüber den Uteri der Kontrolltiere noch deutlich, so daß eine positive Bewertung möglich ist.

2. Untersuchung von ganzen Tierkörpern

a) Subkutane Applikation des aufgearbeiteten Tierkörpers an Testmäuse (Testreihe 2a)

Da bei den vorausgegangenen Untersuchungen nur in der Leber DES-Rückstände nachzuweisen waren und bei der Untersuchung von Geflügel im Rahmen der Lebensmittelüberwachung nicht immer Lebern zur Verfügung stehen, wurden nun die Hähnchen ohne Innereien und Hals tiefgefroren und mit ihren gesamten knöchernen Anteilen in einem KS-Durchlaufkutter fein zerkleinert, anschließend getrocknet und in der unter I. 4. beschriebenen Weise weiter verarbeitet. Die so gewonnenen Extrakte von je 2 Versuchs- und Kontrollhähnchen wurden mit Sesamöl vermischt und je einer Mäuse-Testgruppe in Mengen von 0,2 ml pro Tier am 1., 3. und 5. Tag des Versuches subkutan verabreicht. Zum quantitativen Vergleich wurden entsprechenden Mäusegruppen pro Tier 0,2 ml DES-haltiges Sesamöl an gleichen Tagen injiziert; das Sesamöl enthielt 0, 2, 4, 8 und 16 μ g DES bezogen auf kg Futtermenge. Die Tötung der Tiere erfolgte am 7. Tag nach Versuchsbeginn.

b) Verfütterung des aufgearbeiteten Tierkörpers an Testmäuse (Testreihen 2b - d)

Je 3 weiteren Testreihen (2b - d) wurden die Extrakte von je 2 Versuchs- und Kontrollhähnchen über das Futter verabreicht, und zwar wurden die Ganzkörperextrakte mit anschließend wieder abgedampftem Äther in die entsprechenden Mäusefuttermengen überführt. Als Vergleichswerte wurden Mäuse-Testgruppen angesetzt, die 0, 2, 4, 8 bzw. 16 μ g DES pro kg Futter erhielten. Die Tötung der Testmäuse erfolgte bei der Testreihe 2b am 7., bei den Testreihen 2c und 2d am 6. Tag.

Die Anfangskörpergewichte der Testmäuse aus a) und b) sind in den Tabellen 8, 9 und 10 zusammengestellt; Anzahl und Gewicht der untersuchten Hähnchen in Tabelle 11.

Anfangskörpergewichte der Mäuse (in g) in Testreihe 2a

Nr. des Tieres	Gruppe für behandelte Hähnchen	Gruppe für unbehandelte Hähnchen	Gruppen für quantitativen Vergleich				
			0 J	2 J	4 J	8 J	16 J
1	9,8	9,1	7,7	6,5	6,8	8,2	7,4
2	10,1	6,3	8,2	7,1	10,0	8,2	8,4
3	8,4	9,5	8,8	8,7	8,9	7,3	9,2
4	6,6	6,3	7,4	8,8	9,6	9,8	8,5
5	6,4	9,1	6,9	9,5	6,1	6,9	7,0
Gesamtgewichte	41,3	40,3	39,0	40,6	41,4	40,4	40,5
Durchschnittsgewichte	8,3	8,1	7,8	8,1	8,3	8,1	8,1
Standardabweichung $\pm$	1,72	1,62	0,73	1,26	1,7	1,12	0,89

Tabelle 9

Anfangskörpergewichte der Testmäuse (in g) in Testreihe 2b

Nr. des Tieres	Gruppe für behandelte Hähnchen	Gruppe für unbehandelte Hähnchen	Gruppen für Vergleichswerte				
			0 ♂	2 ♂	4 ♂	8 ♂	16 ♂
1	11,4	9,8	10,4	11,0	10,7	11,3	9,8
2	10,3	10,7	10,4	10,0	10,1	11,2	11,2
3	9,5	10,7	10,7	10,6	10,5	10,4	10,6
4	10,7	11,1	10,3	10,2	11,2	11,0	9,8
5	9,5	9,4	10,0	10,0	9,6	9,0	9,3
Gesamtgewichte	51,4	51,7	51,8	51,8	52,1	52,9	50,7
Durchschnittsgewichte	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5	10,1
Standardabweichung	0,88	0,71	0,25	0,44	0,61	0,95	0,75

Tabelle 10

Anfangskörpergewichte der Mäuse (in g) in Testreihen 2c und 2d

Nr. des Tieres	Gruppen für behandelte Hähnchen		Gruppen für unbehandelte Hähnchen		Gruppen für quantitativen Vergleich				
	Testreihe 2c	Testreihe 2d	Testreihe 2c	Testreihe 2d	0 g	2 g	4 g	8 g	16 g
1	8,4	9,4	8,2	6,5	10,1	8,0	9,5	9,0	7,4
2	10,6	8,8	10,4	6,0	11,4	10,2	9,2	6,6	8,1
3	11,3	6,3	9,6	10,9	9,9	7,0	6,5	6,6	8,4
4	7,3	11,7	8,9	11,1	8,1	8,8	7,0	8,5	8,2
5	6,9	8,0	6,8	8,5	6,2	8,4	11,0	11,0	8,8
Gesamte- gewichte	44,5	44,2	43,9	43,0	45,7	42,4	43,2	41,7	41,2
Durchschnitts- gewichte	8,9	8,8	8,8	8,6	9,1	8,5	8,6	8,3	8,2
Standardab- weichungen	1,97	1,98	1,38	2,68	1,96	1,17	1,86	1,84	0,53

Tabelle 11

Anzahl der in Testreihen 2a - d untersuchten Hähnchen und
Gesamtgewichte des Untersuchungsmaterials in g.

	Anzahl der Hähnchen	Gesamtgewicht (in g)
Testreihe 2a		
behandelt	2	1629
unbehandelt	2	1784
Testreihe 2b		
behandelt	2	1326
unbehandelt	2	1220
Testreihe 2c		
behandelt	2	1450
unbehandelt	2	1560
Testreihe 2d		
behandelt	2	1190
unbehandelt	2	1230

Tabelle 12

Uterusgewichte der Mäuse (in mg) in Testreihe 2a

Nr. des Tieres	Gruppe der behandelten Hähnchen	Gruppe der unbehandelten Hähnchen	Gruppen für quantitativen Vergleich				
			0 g	2 g	4 g	8 g	16 g
1	15,2	6,5	4,8	13,8	20,1	25,1	29,4
2	17,1	8,7	9,8	17,6	15,6	22,7	38,5
3	9,8	8,0	8,6	14,4	22,3	20,0	29,2
4	10,4	7,6	6,2	17,3	19,1	26,0	33,0
5	16,3	9,4	10,0	18,9	16,7	19,4	32,7
Gesamtge- wichte	68,8	40,2	39,4	82,0	93,8	113,2	162,8
Durchschnitts- gewichte	13,6	8,0	7,9	16,4	18,8	22,6	32,6
Standardab- weichungen	3,43	1,1	2,29	1,97	2,68	2,95	3,76

Tabelle 13

Uterusgewichte der Mäuse (in mg) in Testreihe 2b

Nr. des Tieres	Gruppe der behandelten Hähnchen	Gruppe der unbehandelten Hähnchen	Gruppen für quantitativen Vergleich				
			0 g	2 g	4 g	8 g	16 g
1	27,7	8,7	12,7	18,0	24,8	37,3	45,2
2	23,9	10,2	10,2	13,6	20,6	34,8	27,8
3	11,1	8,1	8,4	19,2	23,3	23,5	47,9
4	27,3	11,6	7,0	17,0	23,7	25,6	23,7
5	20,1	8,7	8,0	15,4	24,6	29,0	34,0
Gesamtgewichte	110,1	47,3	46,1	83,2	117,0	150,2	187,6
Durchschnittsgewichte	22,0	9,5	9,2	16,6	23,4	30,0	37,5
Standardabweichungen	6,88	1,43	2,03	2,2	1,68	5,99	8,67

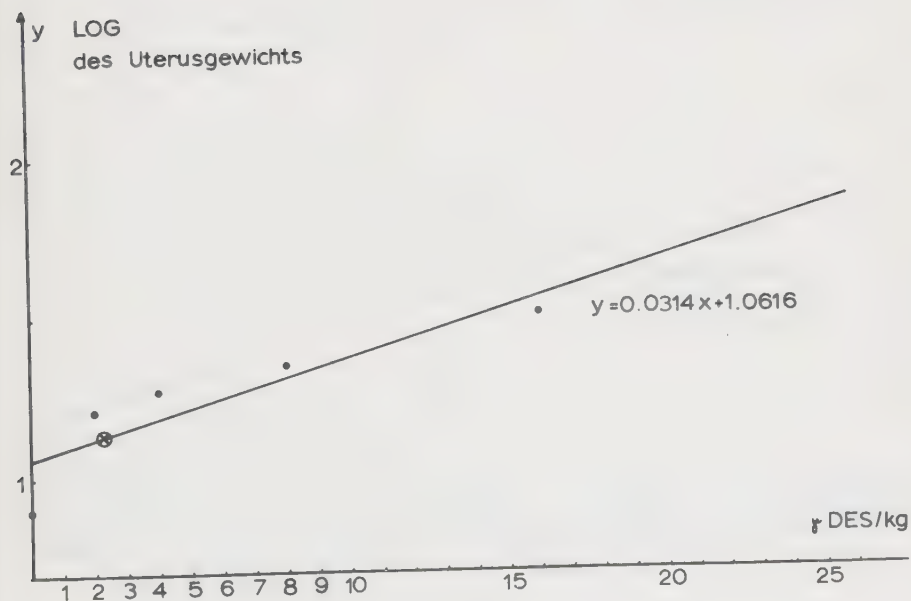


Abb. 3: Regressionskurve für Testreihe 2a
(Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
Verabreichung) mit einem Rückstandswert bei 2,3 µg für
das untersuchte Material

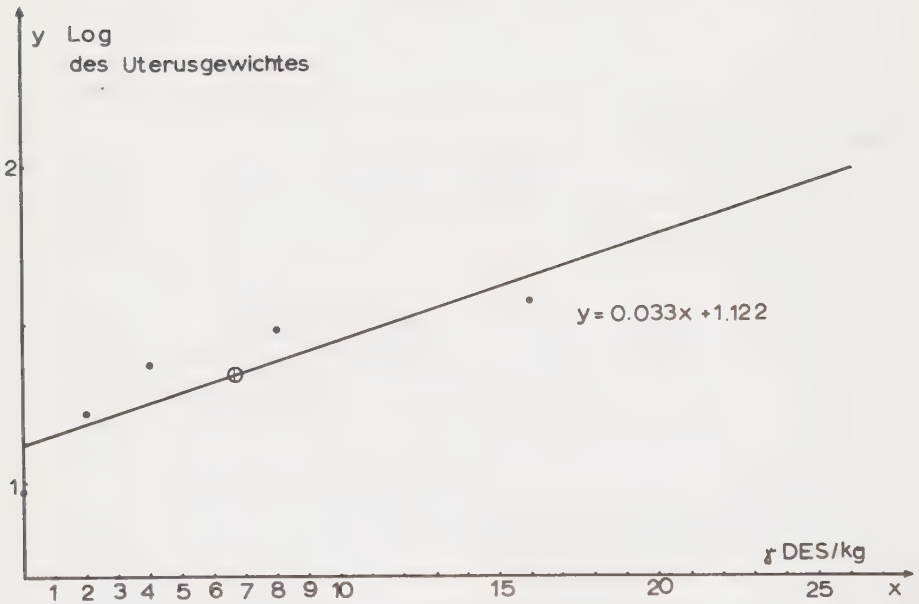


Abb. 4: Regressionskurve für Testreihe 2b
 (Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
 Verabreichung) mit einem Rückstandswert bei 6,7 für
 das untersuchte Material

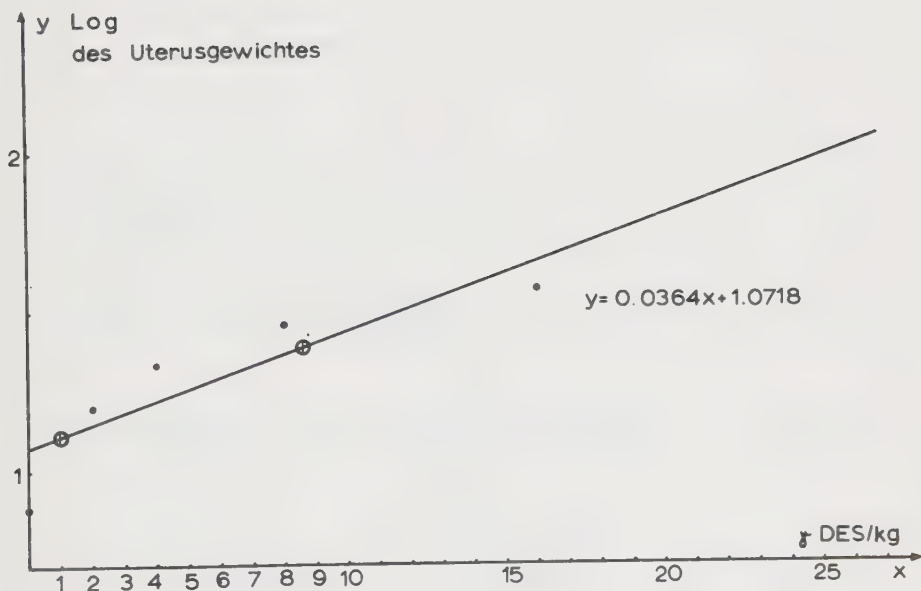


Abb. 5: Regressionskurve für Testreihe 2c und 2d
(Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
Verabreichung) mit Rückstandswerten bei 1 µg (Testreihe 2c)
bzw. 8,6 µg (Testreihe 2d) für das jeweils untersuchte Material

c) Besprechung der Ergebnisse aus den Testreihen 2a - d

Bei Verwendung größerer Mengen an Untersuchungsmaterial ließen sich nach der Behandlung mit KAPAUNETTEN auch außerhalb der Leber östrogenwirksame Rückstände feststellen (Uterusgewichte dieser Testreihe sind aus den Tabellen 12 - 14 ersichtlich). Auch in diesem Versuchsabschnitt erwies sich die Überlegenheit der oralen Verabreichung des Untersuchungsmaterials gegenüber der subkutanen Applikation von Extrakten.

Die Aufnahme des Futters war bei allen Testgruppen nahezu vollständig, so daß eine Korrektur der erhaltenen Ergebnisse nicht erforderlich ist.

Die vorzeitige Auswertung der Testreihen 2c und 2d nach 6 Tagen hatte keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis.

Das niederere Untersuchungsergebnis der Testreihe 2c ist wahrscheinlich auf sehr unterschiedliche Resorption der KAPAUNETTEN zurückzuführen, die nach der Schlachtung der Hähnchen z. T. noch weitgehend erhalten und vollkommen eingekapselt am Kammende gefunden werden konnten. Obwohl die statistische Berechnung für Testreihe 2c einen Rückstandwert ergibt, der nahe der Nachweisgrenze des Mäuseuterus-Testes liegt, ist auf Grund der Uterusgewichte dieser Gruppe auch hier eine positive Bewertung möglich.

In den Abbildungen 3 (Testreihe 2a), 4 (Testreihe 2b) und 5 (Testreihen 2c und d) sind die ermittelten Vergleichswerte als Diagramme dargestellt.

x	y	xy	Sx = 30
			$Sx^2 = 340$
0	0,9	0	Sy = 6,24
2	1,21	2,42	Sxy = 42,46
4	1,27	5,08	$\bar{x} = 6$
8	1,35	10,80	$\bar{y} = 1,25$
16	1,51	24,16	n = 5

Regressionsgleichung für Testreihe 2a: $y = 0,0314 x + 1,01616$

Für das Untersuchungsmaterial ergibt sich somit ein Rückstandswert von 2,38 DES.

Für Testreihe 2b lauten diese Berechnungen:

x	y	xy	Sx = 30
			$Sx^2 = 340$
0	0,96	0	Sy = 6,6
2	1,22	2,44	Sxy = 44,88
4	1,37	5,48	$\bar{x} = 6$
8	1,48	11,84	$\bar{y} = 1,32$
16	1,57	25,12	n = 5

Regressionsgleichung: $y = 0,033 x + 1,122$

Der ermittelte Rückstandswert beträgt also 6,7 DES.

Für Testreihen 2c und d ergibt sich:

x	y	xy	Sx = 30
			$Sx^2 = 340$
0	0,89	0	Sy = 6,45
2	1,20	2,40	Sxy = 44,52
4	1,33	5,32	$\bar{x} = 6$
8	1,46	11,68	$\bar{y} = 1,29$
16	1,57	25,12	n = 5

Regressionsgleichung: $y = 0,0364 x + 1,0718$

Die ermittelten Uteruswerte entsprechen für die Testreihe 2c 1,0 DES und für die Testreihe 2d 8,6 DES.

3. Feststellung von Rückständen in ganzen Tierkörpern bei Verfütterung von östrogenwirksamer Substanz

Bei diesen Untersuchungen hatten 10 Hähnchen 4 Wochen lang Futter erhalten, das 0,0023 % Lipamon enthielt. In den Lebern dieser Tiere wurden bei Paralleluntersuchungen^{+) z. T. östrogenwirksame Rückstände ermittelt.}

Lipamonbehandelte und Kontrolltiere wurden in 4 Versuchsgruppen (Testreihen 3a - d) zu je 1, 2, 3 und 4 Tieren aufgeteilt; nach der Schlachtung in gefrorenem Zustand samt Knochen in einem KS-Durchlaufkutter zerkleinert und zu Extrakten in beschriebener Weise aufgearbeitet. Diese Extrakte wurden entsprechenden Mäuse-Testgruppen mit dem Futter verabreicht. Für quantitative Aussagen erhielten gesonderte Mäusegruppen 0, 2, 4, 8 bzw. 16 μ g DES pro kg Futter. Die Testgruppen bestanden aus je 5 Mäusen; die Versuchsauswertung erfolgte am 6. Tag.

Die Anfangskörpergewichte der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 15 zusammengestellt; in Tabelle 16 Anzahl und Gewicht der jeweils untersuchten Hähnchen.

Besprechung der Ergebnisse:

Die Uterusgewichte der einzelnen Testreihen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Von den lipamonbehandelten Hähnchen konnten nur in Testreihe 3b signifikante östrogenwirksame Rückstände festgestellt werden. Trotz Verarbeitung größerer Mengen von Untersuchungsmaterial gelang es nicht, bei weiteren behandelten Hähnchen Rückstände nachzuweisen. Bei Testreihe 3d scheinen zwar, wie dies die Uterusgewichtszunahmen in dieser Gruppe vermuten lassen, geringe Rückstände östrogenwirksamer Stoffe vorhanden zu sein, doch läßt sich dieser Nachweis statistisch nicht absichern. In Abbildung 6 ist das Ergebnis der Vergleichswerte für Testreihen 3a - d als Diagramm aufgezeigt. Die Regressionsgleichung für Abbildung 6 ergibt sich aus den nachfolgenden Werten:

^{+) durchgeführt von Herrn Univ.-Doz. Dr. H. Karg am Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München}

Tabelle 15

Anfangskörpergewichte der Mäuse (in g) in Testreihen 3a - d

Nr. des Tieres	Gruppen der lipamonbe- handelten Hähnchen				Gruppen der unbehandelten Hähnchen				Gruppen für quantitativen Vergleich			
	Testreihen				Testreihen							
	3a	3b	3c	3d	3a	3b	3c	3d	0 ♂	2 ♂	4 ♂	8 ♂ 16 ♂
1	7,9	8,1	7,0	7,4	7,5	9,5	8,3	9,3	8,3	7,9	7,9	7,2 7,1
2	7,6	9,6	8,0	8,8	9,3	7,5	9,3	7,9	8,2	8,9	7,6	9,4 8,2
3	7,0	8,0	8,8	8,5	8,2	6,6	8,9	9,3	6,8	8,7	7,2	8,8 8,9
4	8,5	7,9	8,2	8,4	8,6	7,9	8,1	7,5	10,8	8,0	8,6	7,8 8,2
5	9,0	8,2	7,2	8,1	7,1	8,5	7,2	6,0	7,5	8,1	8,7	7,2 7,7
Gesamt- gewichte	40,0	41,8	39,2	41,2	40,7	40,0	41,8	40,0	41,6	41,6	40,0	40,4 40,1
Durch- schnitts- gewichte	8,0	8,4	7,9	8,2	8,1	8,0	8,3	8,5	8,3	8,3	8,0	8,1 8,0
Standard- abweichungen	0,78	0,70	0,74	0,53	0,87	1,09	0,83	0,96	1,51	1,45	0,64	0,99 0,67

Tabelle 16

Anzahl der in Testreihen 3a - d untersuchten Hähnchen und
Gesamtgewichte des Untersuchungsmaterials in g

		Anzahl der Hähnchen	Gesamtgewicht (in g)
Testreihe 3a	behandelt	1	803
	unbehandelt	1	967
Testreihe 3b	behandelt	2	1469
	unbehandelt	2	1481
Testreihe 3c	behandelt	3	2269
	unbehandelt	3	2310
Testreihe 3d	behandelt	4	3320
	unbehandelt	4	3260

Tabelle 17

Uterusgewichte der Mäuse (in mg) in Testreihen 3a - d

Nr. des Tieres	Gruppen der lipamonbehandelten Hähnchen				Gruppen der unbehandelten Hähnchen				Gruppen für quantitativen Vergleich			
	3a	3b	3c	3d	3a	3b	3c	3d	0 ♂	2 ♂	4 ♂	8 ♂ 16 ♂
1	14,0	22,1	12,1	11,7	12,1	11,0	8,7	10,4	9,5	13,4	23,4	34,3 38,5
2	9,4	24,4	10,8	15,1	9,2	12,0	10,2	11,3	10,3	16,8	19,2	22,8 38,6
3	11,3	26,2	11,2	12,1	8,4	10,2	8,1	8,7	9,4	12,3	23,2	29,6 32,1
4	11,9	37,5	9,4	13,1	7,3	8,6	11,0	7,4	7,6	19,1	20,9	29,3 46,3
5	9,6	25,3	7,2	17,6	10,2	9,3	8,7	8,3	10,0	12,1	22,7	31,7 41,2
Gesamtgewichte	56,2	135,5	50,7	69,6	47,2	51,1	47,0	46,1	46,8	73,7	109,4	147,7 196,7
Durchschnittsgewichte	11,2	27,1	10,1	13,9	9,4	10,2	9,4	9,2	9,4	14,7	21,9	29,5 39,3
Standardabweichung	1,88	6,01	1,91	2,44	1,83	1,35	1,32	1,59	1,05	3,08	1,79	4,27 5,14

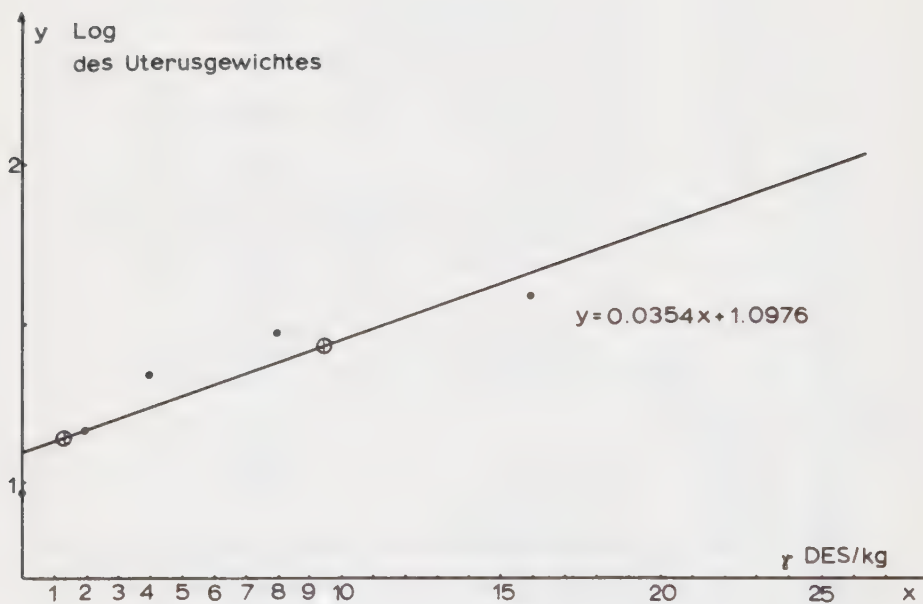


Abb. 6: Regressionskurve für Testreihen 3a - d
(Zunahme des Mäuseuterusgewichtes bei definierter DES-
Verabreichung) mit Rückstandswerten bei 1, 3 μ g (Test-
reihe 3d) und 9, 5 μ g (Testreihe 3b) für das jeweils unter-
suchte Material

x	y	xy	Sx = 30
			$Sx^2 = 340$
0	0,97	0	Sy = 6,54
2	1,17	2,34	Sxy = 44,9
4	1,34	5,36	$\bar{x} = 6$
8	1,47	11,76	$\bar{y} = 1,31$
16	1,59	25,44	n = 5

Regressionsgleichung für die Testreihen 3a - d:

$$y = 0,0354 x + 1,0976$$

Für die Testreihe 3b lassen sich somit 9,5 µg DES im verwendeten Untersuchungsmaterial ermitteln. Die Rückstandsmenge von 1,3 µg DES für die Testreihe 3d liegt an der Nachweisgrenze des Mäuseuterus-Testes und ist statistisch nicht zu sichern.

D. DISKUSSION

Der Mäuseuterus-Test ist im Routinebetrieb für den Nachweis von östrogenwirksamen Rückständen in kapaunisierten Schlachthähnchen geeignet.

Da marktfertige Hähnchen meist ohne Innereien, Kopf und Hals zur Untersuchung vorliegen und im Fleisch nur geringe Mengen an östrogenwirksamen Rückständen erwartet werden können, ist die Aufarbeitung größerer Mengen an Untersuchungsmaterial notwendig. Bei der Untersuchung von ganzen Tierkörpern ist vor allem dann mit positiven Ergebnissen zu rechnen, wenn mehrere Tiere zusammen getestet werden. Auf der Basis der beschriebenen Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials und bei peroraler Applikation gestattet der Mäuseuterus-Test eine sichere Überwachung von geschlachteten Hähnchen im Hinblick auf § 4b Nr. 2 LMG. Eventuelle Unsicherheiten bei der Auswertung des Mäuseuterus-Testes wie in den Testreihen 3 könnten durch eine histologische Beurteilung der Uterusveränderungen ausgeschaltet werden, wie dies THIEL und SCHAAL (88, 89) angeregt hatten.

Die bei diesem Verfahren vorgesehene Untersuchung des Fettanteils der Hähnchen läßt auch kleinste Mengen (1 - 2 μ g pro kg) östrogenwirksamer Substanzen noch ausreichend sicher nachweisen, da solche Stoffe zum größten Teil fettlöslich sind und vorwiegend in Fettgewebe gespeichert werden.

HOPWOOD und andere Autoren (42, 68, 24) berichten, daß etwaige Um- oder Abbauprodukte von östrogenwirksamen Substanzen zum größten Teil inaktiviert werden und in wasserlöslicher Form vorliegen, so daß diese Rückstände beim vorwiegend qualitativen Test vernachlässigt werden können. In Grenzfällen könnten jedoch wäßrige Auszüge des Untersuchungsmaterials das Ergebnis festigen. Die Verabreichung von wäßrigen Extrakten an Testttiere müßte ebenfalls peroral erfolgen.

Die quantitative Auswertung der Testergebnisse erübrigt sich im Routinebetrieb, da nach § 4b (2) LMG jede Anwendung von östrogenwirksamen Verbindungen zu Mastzwecken verboten ist. Der qualitative Test dauert etwa 6 Tage und kann nach RINJARD und ZUNDEL (99) auf 2 - 3 Tage verkürzt werden.

Für sehr große Materialmengen könnten auch Ratten in entsprechendem Alter verwendet werden. Es sollten jedoch in einem gemeinsamen Untersuchungsgang nicht mehr als 4 - 5 Hähnchen geprüft werden, da im Tierkörper physiologisch enthaltene Östrogenmengen durch Addition positive Untersuchungsergebnisse vortäuschen könnten.

Zur Auswertung der Untersuchungsergebnisse ist es notwendig, parallel entsprechende Mäusegruppen mit bekannten Mengen östrogenwirksamer Substanzen zu testen, da zum Vergleich geeignete Kontrollhähnchen praktisch nicht zu beschaffen sind. Für die Untersuchungen muß Mäusefutter verwendet werden, das frei ist von östrogenwirksamen Anteilen. Die mit Untersuchungsmaterial versetzten Tagesfutterrationen der Testtiere müssen so bemessen werden, daß eine möglichst vollständige Aufnahme gesichert ist.

Bei Masthähnchen, denen mit dem Futter östrogenwirksame Stoffe verabreicht wurden, gelingt es nicht immer Rückstände im extrahierten Fett nachzuweisen; dies gilt selbst für solche Fälle, in denen die Lebern der behandelten Hähnchen im Mäuseuterus-Test positiv reagierten. Um bei derartig behandeltem Marktgeflügel zu definitiven Aussagen zu gelangen, sollte die Stichprobenzahl erhöht werden, damit dann sowohl die Fettanteile als auch wäßrige Extrakte des Probenmaterials mit Hilfe des Mäuseuterus-Testes untersucht werden können. Die Forderung von THIEL und SCHAAL (88, 89) nach einer Vermarktung der Schlachttierkörper samt Kopf und Hals ist zwar a priori problematisch, jedoch, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ohnehin dann etwas überholt, wenn durch entsprechende Aufarbeitung von größeren Mengen Untersuchungsmaterial die Chance der Erfassung östrogenwirksamer Rückstände gesteigert wird.

Die in eigenen Versuchen festgestellten Rückstandswerte lassen sich jedoch nur mit gewissen Vorbehalten mit den Ergebnissen der angeführten Autoren vergleichen, da die Unterschiede in den verwendeten Präparaten und den übrigen Versuchsbedingungen einen direkten Vergleich unmöglich machen. Doch auch bei entsprechenden Behandlungsbedingungen der Hähnchen und vergleichbaren Hormonpräparaten wie sie bei KARG (52) sowie THIEL und Mitarbeiter (88, 89) vorlagen, waren aus den Tierkörpern der Schlachthähnchen weder bei Verfütterung, noch bei Implantation des Östrogenpräparates Rückstände nachzuweisen; obwohl z.B. bei Karg die positiven Leber- und Galleuntersuchungen auf ein Vorhandensein von östrogenwirksamen Rückständen hinwiesen. Somit scheint der Nachweis von östrogenen Hormonrückständen im Schlachttierkörper in erster Linie von der Menge des untersuchten Materials abhängig zu sein.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Literaturteil wurden die Anwendung östrogenwirksamer Substanzen zu Mastzwecken, die dabei zu erwartenden Nebenwirkungen, Gefahren für die menschliche Gesundheit sowie Nachweismöglichkeiten besprochen.
2. 40 östrogenbehandelte bzw. unbehandelte Masthähnchen wurden mit Hilfe des Mäuseuterus-Testes auf östrogenwirksame Rückstände untersucht. 10 Tiere erhielten 4 Wochen vor der Schlachtung einmalig 20 mg Diäthylidioxystilben ("KAPAUNETTEN" Bayer) implantiert; 10 weitere Tiere wurden 4 Wochen lang mit 0,0023 % Dienöstroldiacetat-Futterzusatz ernährt.
3. Mit Hilfe des Mäuseuterus-Testes konnten bei den mit Implantaten behandelten Tieren sowohl in der Leber, als auch, was für die Lebensmittelkontrolle von außerordentlicher Bedeutung ist, im extrahierten Gesamtfett eines oder mehrerer Schlachttierkörper gemeinsam (ohne Innereien, Kopf und Hals) DES-Rückstände festgestellt werden.
4. Bei Verfütterung der östrogenwirksamen Stoffe an Hähnchen waren, selbst beim positiven Nachweis in Leber und Galle, nur im Einzelfall DES-Rückstände im Schlachttierkörper nachzuweisen. Eine Vergrößerung der Probenmenge brachte keine signifikant günstigeren Ergebnisse.

- Durch Verfütterung des Probenmaterials an die Testmäuse und Verkürzung der Testdauer auf 5 Tage wird die Durchführung des Mäuseuterus-Testes vereinfacht. Die Empfindlichkeit leidet nicht darunter.
- 5. Für die Lebensmittelüberwachung genügt eine qualitative Auswertung des Mäuseuterus-Testes, wozu jedoch Vergleichstests mit bekannten Östrogenmengen erforderlich sind; die Vergleichsuntersuchung von unbehandelten Hähnchen wird aber dadurch überflüssig.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abderhalden, R.: Die Hormone.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952;
2. Andrews, F. N., und W. M. Beeson:
The effect of various methodes of estrogen administration on the growth and fattening of wether lambs.
J. Animal Sci. 12 (1953), 182;
3. Andrews, F. N., W. M. Beeson und F. D. Johnson:
The effect of stilbestrol, dienestrol, testosterone and progesterone on the growth and fattening of beef steers.
J. Animal Sci. 14 (1955), 99;
4. Bajez, W.: Versuch zur hormonalen Sterilisierung weiblicher Schweine mit Retalon.
Wiener Tierärztl. Mschr. 37 (1950), 197;
5. Banes, D.: The Irradiation of Diethylstilbestrol.
J. Ass. Off. Agric. Chem. 44 (1961), 323;
6. Barth, K., und H. Karg: Untersuchungen über die Wirkung von Diäthylstilböstrol- und Hydroxycinzusätzen bei der Mast von Jungbullen.
Z. Tierphysiol., Tierernähr. und Futtermittelk. 15 (1960), 236;
7. Birds, S., L. J. Purgsley und M. O. Klotz:
The quantitative recovery of synthetic estrogens from tissues of birds (gallus domesticus), the response of the birds testis, comb and epidermis to estrogen and of humans to ingestion of tissues from treated birds.
Endocrinology 41 (1947), 282;

8. Böhmer, A., und J. Grossfeld:
Allgemeine Untersuchung der Speisefette.
Hdb. d. Lebensmittelchemie, Bd. 4,
Springer-Verlag, Berlin 1939;
9. Bolle, W.:
Ein neues Verfahren zur hormonalen Steri-
lisierung von Hähnchen mit "Kapaunetten".
Vet. Med. Nachr. 3 (1950), 53;
10. Brooks, C. C., G. B. Garner, M. E. Muhrer und W. H. Pfander.:
The effect of fat and diethylstilbestrol on
cellulose digestion by sheep rumen microorga-
nisms.
Ref. in J. Animal Sci. 12 (1953), 909;
11. Brüggemann, J., H. Karg und K. Barth:
Zur Problematik des Einsatzes von Sexualhor-
monen in der Nutztiermast.
Kraftfutter 41 (1958), Nr. 4, 5 und 6;
12. Brüggemann, J., und H. Karg:
Hormone in der Tiermast.
6. Symposium Dt. Ges. f. Endokrin. Kiel,
28. - 30. April 1959;
13. Bryce-Jones, K., J. M. Harries und T. W. Houston:
Studies in beef quality. III. Effects of
hexestrol implantation.
J. Sci. Food Agric. 15 (1964), 62;
14. Burroughs, W., C. C. Culbertson, J. Kastellic, E. W. Cheng
und W. H. Hale:
Oral administration of diethylstilbestrol
for growth and fattening in beef cattle.
Ref. in J. Animal Sci. 13 (1954), 978;
15. Butenandt, A.:
Zur physiologischen Bedeutung des Follikel-
hormons und der östrogenen Wirkstoffe für
die Genese des Brustdrüsenkrebses und die
Therapie des Prostatakarzinoms.
Klinik und Forschung 1 (1950);

16. Butenandt, A., und E. v. Ziegner:
 Über die physiologische Wirksamkeit des
 kristallisierten weiblichen Sexualhormons
 im Allen-Doisy-Test. Untersuchungen
 über das weibliche Sexualhormon.
 (3. Mitteilung).
 Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiol. Chem.
188/189 (1930), 1;
17. Camp, A. A.: Zit. nach Brüggemann, Karg und Barth
 (11);
18. Camp, A. A., J. R. Couch und J. H. Quisenberg:
 Response to diethylstilbestrol injections of
 growing chicks fed various protein levels.
 Poultry Sci. 36 (1957), 171;
19. Chaikoff, J. L.: Zit. nach Brüggemann, Karg und Barth
 (11);
20. Clegg, M. T., und H. H. Cole:
 The action of stilbestrol on the growth
 response in ruminants.
 J. Animal Sci. 13 (1954), 108;
21. Colombel, J. M. G.: Zit. nach Spörri (84);
22. Curtis, J. M., und E. A. Doisy:
 Zit. nach Flaschenträger und Lehnartz
 (24);
23. Detwiler, R. W., F. N. Andrews und B. B. Bohren:
 The influence of thioruazil and stilbestrol
 on broiler quality.
 Poultry Sci. 29 (1950), 513;
- 23 a. Druckrey, H.: Über östrogenen und cancerogene Wirkung.
 Zschr. f. Krebsforsch. 506 (1940), 27;

24. Flaschenträger, B., und E. Lehnartz:
 Physiologische Chemie. Bd. 1, S. 427,
 Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
 berg 1951;

25. Firegood, H. B., und J. B. Gast:
 The identification and quantitative micro-
 determination of estrogen by ultraviolet
 absorption spektrophotometry.
 Rec. Prog. Horm. Res. 2 (1948), 31;

26. Eichholtz, F.:
 Lehrbuch der Pharmakologie. 9. Auflage
 Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
 berg 1957;

27. Engst, R.:
 Die östrogene Mast der Schlachttiere als
 lebensmittelhygienisches Problem.
 Mitteilungsbl. d. GDCh-Fachgr. Lebens-
 mittelchemie 18 (1964), 249;

28. Eschweiler, J.:
 Die Wirkung hoher Dosen von Dienöstro-
 l auf die Muskulatur des Geflügels.
 Diss. med. vet., München 1953;

29. Galli-Mainini, G.:
 Zit. nach Flaschenträger und Lehnartz
 (24);

30. Gassner, F. X.:
 Zit. nach Brüggemann, Barth und Karg
 (11);

31. Gassner, F. X., R. P. Martin und J. W. Algeo:
 Hormone in der Tiermast.
 6. Symposium Dt. Ges. f. Endokrin. Kiel,
 28. - 30. April 1959;

32. Gassner, F. X., E. C. Reifenstein, J. W. Algeo und W. E. Mattox:
 Zit. nach Karg (49);

33. Godfrey, E. F., und R. G. Jaap:
Some effects of sex hormones on bone
development and growth.
Poultry Sci. 30 (1951), 915;
34. Gossett, F. O., F. H. Smith und F. A. Downing:
Zit. nach Brüggemann, Barth und Karg
(11);
35. Gousaga, A., und K. Simon; Zit. nach Brüggemann, Barth und Karg
(11);
36. Halama, A. K.: Hormonale Rindermast.
Wiener Tierärztl. Wschr. 45 (1958), 768;
37. Halama, A. K.: Hormonale Rindermast. III. Jungtiermast-
versuche mit zeitlich begrenzter Stilböstrol-
fütterung.
Wiener Tierärztl. Wschr. 46 (1959), 454;
38. Heim, G.: Ist Fleisch hormonal gemästeter Tiere ge-
sundheitlich bedenklich?
Fleischwirtschaft 7 (1955), 303;
39. Höpler, W.: Zit. nach Barth und Karg (6);
40. Hopwood, M. L.: The metabolism of diethylstilbestrol in the
domestic fowl. Thesis Th. D. Colorado
State University, Fort Collins 1960;
41. Hopwood, M. L., und F. X. Gassner:
Metabolism of ¹⁴C-diethylstilbestrol in the
chicken; Retention and excretion.
Endocrinology 70 (1962), 880;
42. Hopwood, M. L., H. Karg und F. X. Gassner:
Conjugation of ¹⁴C-diethylstilbestrol by
chicken liver in vitro.
Endocrine Section, Colorado State Univer-
sity Fort Collins, Colorado. Unveröffent-
lichte Mitteilung;

43. Hoppe-Seyler und Thierfelder: Colorimetrische Östrogenbestimmung
Hdb. d. physiologisch- und pathologisch-
chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. 5,
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1953;
44. Huf, E.: Experimentelle Pharmakologie der Follikel-
hormone und der östrogenen Stilbene.
Klin. Wschr. 20 (1941), 729;
45. Huf, E.: Experimentelle Pharmakologie der Folli-
kelhormone und der östrogenen Stilbene.
II. Pathologische und toxikologische Wir-
kungen.
Klin. Wschr. 20 (1941), 755;
46. Jaap, R. G., und R. Thayer: Oral administration of estrogens in Poultry.
Poultry Sci. 13 (1944), 249;
47. Kaufmann, C., A. H. Müller, A. Butenandt und H. Friedrich-Freska:
Experimentelle Beiträge zur Bedeutung des
Follikelhormons für die Carcinomentste-
hung.
Z. f. Krebsforsch. 56 (1949), 482;
48. Karg, H.: Autoreferat nach dem Vortrag:
Rückstandsprobleme nach Östrogenanwen-
dung in der Nutztiermast.
Trier, 26.9.1962;
49. Karg, H.: Einsatz von Stoffen mit Hormonwirkung.
Kraftfutter 44 (1961), 389;
50. Karg, H.: Possibilités et limites de l'utilisation de
substances hormonales actives sur l'en-
graissement des animaux domestiques.
Economie et Médecine Animales 3 (1962),
337;

51. Karg, H.: Tierarzt und Lebensmittelgesetz.
Zur Frage der Östrogenanwendung in der
Jungbullenmast. Berliner u. Münchner
Tierärztl. Wschr. 75 (1962), 124;
- 51.a. Karg, H.: Einsatz von Wirkstoffen in der Tierhaltung
und endokrine Testesfunktion.
Tierärztl. Umschau 19 (1964), 292;
52. Karg, H.: Persönliche Mitteilung;
53. Kilger, E.: Versuche zur hormonalen Kastration von
Hähnchen.
Diss. med. vet., München 1950;
54. Klostermann, E. W., V. R. Cahill, L. E. Kunkle und A. Moxon:
The subcutaneous implantation of stilbestrol
in fattening bulls and steers.
J. Animal Sci. 14 (1955), 1050;
55. Klostermann, E. W., L. E. Kunkle, P. Gerlaugh und V. R. Cahill:
The effect of age of castration upon rate
and economy of gain and carcass quality
of beef calves.
J. Animal Sci. 13 (1954), 817;
56. Koch, W.: Zit. nach Karg (50);
57. Koch, W., und G. Heim: Die Speicherung von Östrogenen im Tier-
körper. I. Hormonal kastrierte Hähnchen.
Endokrin., Leipzig 29 (1952), 288;
58. Koch, W., und G. Heim: Die Speicherung von Östrogenen im Tier-
körper. II. Hormonal gemästete Schweine.
Endokrin., Leipzig 30 (1953), 335;
59. Koch, W., und G. Heim: Die Speicherung von Östrogenen im Tier-
körper. III. Hormonal gemästete Kühe.
Endokrin., Leipzig 32 (1955), 148;

60. Küst, D., und F. Schätz: Die Besamung beim Rind.
F. Enke-Verlag, Stuttgart 1954;
61. Lacassagne, H.: Les hormones et leurs relations avec le cancer.
Schweizer Med. Wschr. 78 (1948), 705;
62. Lindsay, S., F. W. Lorenz, C. Entenmann und J. L. Chaikoff:
Produktion of Atheromatosis in the Aorta of the Chicken by Administration of Diethylstilbestrol.
Proc. Soc. Exp. Biol. 62/63 (1946), 315;
63. Lorenz, F. W.: The Fattening action of orally administered synthetic estrogens as compared with diethylstilbestrol pellet implants.
Poultry Sci. 25 (1945), Notes, 91;
64. Lorenz, F. W.: The use of estrogens for fattening poultry in hormonal relationships and applications in the production of meat, milk and eggs.
Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Council Publ. 266 (1953), 5;
65. Lorenz, F. W.: Effects of Estrogens on Domestic Fowl and Applications in the Poultry Industry.
Vitamins and Hormones 12 (1954), 235;
66. Martin, L.: The use of 2-3-5-triphenyltetrazolium-chloride in the biological assay of estrogens.
J. Endocrin. 20 (1960), 187;
67. Martin, L., R. J. Cox, und C. W. Emmens:
The rate of uptake of locally applied oestrone by the vaginal epithelium of the mouse.
J. Endocrin. 22 (1961), 129;

68. Mazur, A., und E. Shorr: The isolation of stilbestrol monoglucuronides from the urine of rabbits.
J. Biol. Chem. 144 (1942), 283;
69. Mc Kinley, W. P., H. Gice und M. R. E. Conell:
Zit. nach Spörri (84);
70. Merker, P. C., L. D. Edwards, F. N. Andrews und J. E. Christian:
The estrogenic activity of residues obtained from chickens treated with pellets of diethylstilbestrol.
Poultry Sci. 34 (1955), 1118;
71. Mitchell, G. E., A. L. Neumann und H. K. Draper:
Metabolism of tritium-labelled diethylstilbestrol by steers.
Ref. in J. Animal Sci. 15 (1956), 1285;
72. Napp, J. H.: Klinik und Therapie der Nebenwirkungen. Weibliche Sexualhormone.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1960;
73. Neseni, R.: Hormon-Kapauner durch Folöstrol T. Tierzucht 3 (1950), 54;
74. Neuhoff, H.: Das hormonale Kapaunisieren unter besonderer Berücksichtigung von der Resorption des Diäthyl-dioxystilbens.
Diss. med. vet., München 1952;
75. Nordfeldt, S.: Zit. nach Barth und Karg (6);
76. Parkes, A. S.: Relative duration of action of various esters of oestrone, oestradiol and oestriol.
Biochem. J. 31 (1937), 579;
77. Pieterse, P. J. S., und F. N. Andrews:
The estrogenic activity of alfalfa and other foodstuffs.
J. Animal Sci. 15 (1956), 25;

78. Preston, T. R., und J. Gee: Effect of hexoestrol on carcass composition and efficiency of food utilisation in fattening lambs.
Nature, L. 179 (1957), 247;
79. Rjasanki, M. P.: Subkutane Injektion von Diäthylstilböstrol bei der Mast von kastrierten Jungbullen.
Tierheilkunde (Russisch) 35 (1958), 86;
Ref. in Landwirtsch. Zbl. III (1959), 193;
80. Rollin, H. T., R. G. Jaap und R. Penquite:
Fattening chickens by feeding estrogens.
Poultry Sci. 14 (1945), 483;
81. Ruliffson, W. S., T. D. Bell, J. S. Hughes und A. Nunn:
Neutral 17-ketosteroids in the urine of normal and diehtylstilbestrol treated wether lambs.
J. Animal Sci. 13 (1954), 1030;
82. Schole, J.: Zit. nach Karg (50);
83. Schmährl, D.: Zit. nach Brüggemann, Karg und Barth (11);
84. Spörri, H.: Persönliche Mitteilung;
85. Spörri, H., und L. Candinas: Zit. nach Karg (50);
86. Stob, M., F. Andrews, M. X. Zarrow und W. M. Beeson:
Estrogenic activity of the meat of cattle, sheep and poultry following treatement with synthetic estrogens and progesterone.
J. Animal Sci. 13 (1954), 138;
87. Stob, M., T.W. Perry, F. N. Andrews und W. M. Beeson:
Residual estrogen in the tissues of cattle treated orally with diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol and chlortetracycline.
J. Animal Sci. 15 (1956), 997;

88. Thiel, W., und E. Schaal: Untersuchungen über den Nachweis von östrogenen Stoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft.
I. Mitt.
Fleischwirtschaft 14 (1962), 400;
89. Thiel, W., und E. Schaal: Untersuchungen über den Nachweis von östrogenen Stoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. II. Mitt.
Fleischwirtschaft 14 (1962), 1155;
90. Tschiderer, K.: Rindermastversuch mit Sexualhormonen in Österreich.
Arch. Tierernähr. 9 (1959), 202;
91. Umberger, E. J., D. Banes, F. M. Kunze und S. H. Colson: Chemical Determination of Diethylstilbestrol Residues in the Tissues of Treated Chickens.
J. Ass. Off. Agric. Chem. 46 (1963), 471;
92. Umberger, E. J., G. H. Gass und J. M. Curtis: Design of a biological assay method for the determination of estrogenic residues in the edible tissues of domestic animals treated with estrogens.
Endocrinology 63 (1958), 806;
93. de Vuyst, A., und A. Moreels: Rémanence de l'activité oestrogénique de muscles de poulets.
Bulletin de l'Académie Royale de Médecine de Belgique, 1964;
94. v. Wattenwyl, W.: Zit. nach Neuhoff (74);
95. Whitehair, C. K., N. D. Gallup und M. C. Bell: Effects of stilbestrol on ration digestibility and on calcium, phosphorus and nitrogen retention in lambs.
J. Animal Sci. 12 (1953), 331;

96. Zimmermann, W. H.: Krebsauslösende Wirkung des Östrogens.
Dt. Gesundheitswes. 11 (1949), 478;
97. Zondek, B., und S. Aschheim:
Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn.
(Durch Hormonnachweis).
Klin. Wschr. 7 (1928), 8;
98. Zondek, B., und F. Sulman: Inactivation of diethylstilbestrol in the or-
ganism.
Nature, L. 144 (1939), 596;
99. Zundel, A., und P. Rinjard: A propos du contrôle des oestrogènes dans
les denrées alimentaires.
Rec. Méd. Vét. 138 (1962), 971;
100. Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln
und Bedarfsgegenständen (Lebensmittelge-
setz). In der Fassung der Bekanntmachung
vom 17. Januar 1936 (RGBl I, S. 18), der
ÄnderungsVO vom 14.8.1943 (RGBl I,
S. 488), des Änderungsgesetzes vom 21.
12.1958 (BGBl I, S. 950) und des zweiten
Gesetzes zur Änderung des Arzneimittelge-
setzes vom 23. Juni 1964 (BGBl I, S. 365,
Art. 2).

Herrn Prof. Dr. L. Kotter schulde ich für die Überlassung des Themas sowie für Anregungen und kritische Durchsicht der Arbeit herzlichen Dank.

Auch den Herren Prof. Dr. O. Prändl (jetzt: Tierärztliche Hochschule in Wien) und Universitätsdozenten Dr. G. Terplan sowie Herrn Universitätsdozenten Dr. H. Karg am Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere bin ich für die stets freundliche und großzügige fachliche Unterstützung ebenfalls sehr verpflichtet. Herrn Universitätsdozenten Dr. H. Karg besonders auch deshalb, weil er mir zugleich bei der Beschaffung von Untersuchungsmaterial behilflich war.

Schließlich gilt mein Dank auch Fräulein Dr. Chr. Herrmann, die liebenswürdigerweise die erste Korrektur der Arbeit übernommen hatte.

LEBENS LAUF

Am 31. Mai 1939 wurde ich als zweiter Sohn des Dr. med. Eugen Schröder und seiner Frau Paula, geb. Scherzler in Reutlingen geboren. Ab Herbst 1945 besuchte ich die Jos-Weiß-Grundschule in Reutlingen von wo ich 1949, nach bestandener Aufnahmeprüfung, in das Friedrich-List-Gymnasium - ebenfalls in Reutlingen - überwechselte. Im Frühjahr 1958 legte ich dort das Abitur im neusprachlich-naturwissenschaftlichen Zug ab. Im SS 1958 immatrikulierte ich mich an der Universität München zum Studium der Veterinärmedizin. Nach 9 Semestern legte ich im Wintersemester 1962/63 das Tierärztliche Staatsexamen ab und begann im Mai 1963 bei Herrn Dr. E. Fiebiger in Bopfingen/Württ. meine Veterinärpraktikantenzeit. Nach der Approbation, die ich am 1. Nov. 1963 erhielt, arbeitete ich dort weiter als Assistent bis Dezember 1963, um anschließend wieder nach München zurückzukehren. Von Januar bis Mai 1964 war ich am Vieh- und Schlachthof der Stadt München als Hilfstierarzt tätig und erhielt im Mai 1964 die Möglichkeit am Institut für Nahrungsmittelkunde der Universität München als wissenschaftlicher Mitarbeiter einzutreten. Hier arbeite ich seitdem in der Abteilung für Radioaktivität.

